



Efeito do cultivo *in vitro* na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimatação



Paulo A. V. Barroso¹, Gioconda E. D. D. Moura², Lucila K. F. Brito², Camila P. Martins²,
Cristiane E. C. Macedo³, Daniela B. Lopes⁴ & Magdy A. I. Alloufa²

¹ Embrapa Algodão. E-mail: pbarroso@cnpa.embrapa.br (Foto)

² Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais - Depto. de Botânica, Ecologia e Zoologia, UFRN. Campus Universitário, Br 101, CEP 59078-370, Natal, RN

³ Depto. de Genética e Biologia Celular, UFRN

⁴ Embrapa Semi-Árido

Protocolo 154 - 24/10/2002 - Aprovado em 17/10/2003

Resumo: A cultura de tecidos tem sido utilizada como ferramenta para gerar e selecionar variabilidade genética que confira maior tolerância das espécies cultivadas à salinidade. Plantas de abacaxi das variedades Pérola e Smooth Cayenne foram micropropagadas em meio de cultura contendo zero, 12,5 e 25 mM de NaCl e avaliadas durante a fase de aclimatação quanto às alterações induzidas pelo NaCl durante o cultivo *in vitro* e para determinar o melhor parâmetro para quantificar estas alterações. Foram avaliados os caracteres altura das plantas, diâmetro da roseta foliar, número de folhas, comprimento e largura da folha 'D' aos 0, 15, 45, 75 e 105 dias após a instalação do experimento. Observou-se que as plantas micropropagadas em meio com NaCl e sem NaCl apresentaram médias e taxas de crescimento semelhantes, mas diferiram quanto às correlações entre os caracteres e às variâncias fenotípicas. Os resultados indicaram que a variância fenotípica foi o parâmetro mais adequado para avaliar o impacto da seleção *in vitro* sobre caracteres aparentemente não relacionados com a salinidade em plantas de abacaxi.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, cultura de tecidos, salinidade

Effects of *in vitro* culture in the presence of NaCl in pineapple plants during the acclimatization phase

Abstract: Plant tissue culture has been used to induce and select genetic variability in order to increase the level of salinity tolerance in several species. Pineapple plants from Pérola and Smooth Cayenne varieties were micropropagated for six months in a medium with 0, 12.5 and 25 mM of NaCl and evaluated during the acclimatization phase to verify the changes induced by NaCl during *in vitro* cultivation and to determine the best parameter to quantify these changes. The traits evaluated for plant height, plant diameter, leaf number, length and width of the D leaf at 0, 15, 45, 75 and 105 days after the installation of the experiment. There was no effect of different levels of NaCl during the micropropagation on the traits and mean growing rates. Differences were found in the correlation coefficients between the characters and mainly, in the phenotypic variances. The results indicated that the phenotypic variances were more adequate to evaluate the impact of *in vitro* selection for NaCl tolerance on traits apparently not related to salinity in pineapple plants.

Key words: *Ananas comosus*, tissue culture, salinity

INTRODUÇÃO

A salinidade é um dos problemas da agricultura em regiões semi-áridas (Blaine et al., 1993). Sob as condições climáticas presentes no semi-árido, o aumento do teor de sais solúveis no solo é um processo natural, pois o déficit de precipitação em relação à evapotranspiração promove o acúmulo de sais nas camadas superficiais do solo, prejudicando o desenvolvimento das plantas (Fageria & Gheyi, 1997). O manejo inadequado da irrigação pode acelerar este processo, por meio da introdução

de sais via água de irrigação associado ao controle deficiente da drenagem. Este fato vem sendo constatado na região Nordeste do Brasil, nas áreas mais intensamente cultivadas com o uso da irrigação (Oliveira, 1997).

Teores de NaCl na água de irrigação a partir de 1,85 e 3,00 dS m⁻¹ afetaram negativamente a qualidade dos frutos de abacaxi da variedade 'Red Spanish' (Alvarez et al., 1995) e o comportamento de plantas jovens da variedade Smooth Cayenne (Marinho et al., 1998), respectivamente. Estes valores são similares aos obtidos por Blaine et al. (1993), que

classificaram o abacaxi como mediamente tolerante à salinidade. O aumento da tolerância à salinidade em cultivares de abacaxi pode resultar em uma nova opção agrícola para as áreas em que o teor excessivo de sais no solo seja um fator limitante.

A cultura de tecidos tem sido utilizada em diversos trabalhos na tentativa de obtenção de genótipos mais tolerantes a estresses bióticos e abióticos. Diversas metodologias foram empregadas por seus autores, tendo todas em comum o uso da variabilidade gerada durante o processo de cultivo *in vitro*, denominada variação somaclonal (Ferreira et al., 1998). A busca por somaclones mais tolerantes à salinidade tem sido realizada em diversas espécies, como arroz (Winicov, 1996; Lutts et al., 1998), trigo (Barakat & Harris, 1998), alfafa (Safarnejad et al., 1996), soja (Liu & Staden, 2000) e tomate (Boscherini et al., 1999). De modo geral, a identificação de indivíduos portadores de variações somaclonais que confirmam melhor adaptação à salinidade é realizada ainda *in vitro* pela adição de NaCl ao meio de cultura. Assim como os genótipos obtidos por técnicas de melhoramento convencional, as plantas obtidas *in vitro* devem ser avaliadas para verificar a eficiência da metodologia, conhecer o seu comportamento em relação à salinidade no solo e determinar o efeito das condições da cultura *in vitro* em outros caracteres importantes para a cultura.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a adição de NaCl ao meio durante o cultivo *in vitro* altera o comportamento de caracteres vegetativos das plantas de abacaxi durante a fase de aclimação e determinar o parâmetro mais adequado para quantificar estas alterações.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 279 plantas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) oriundas de micropropagação *in vitro*, sendo 175 plantas da variedade 'Pérola' e 104 da variedade 'Smooth Cayenne'. Durante o cultivo *in vitro* as plantas foram mantidas por 6 meses em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose, mio-inositol, benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético e solução orgânica de White. O meio também continha NaCl nas concentrações de 0, 12,5 e 25 mM. Um mês antes da aclimação, as plantas foram colocadas em meio MS sem NaCl e reguladores de crescimento. Após o cultivo *in vitro*, as plantas foram retiradas do meio de cultura, lavadas para retirar o meio aderido às suas raízes, mantidas três dias em água e plantadas em sacos de polipropileno (500 g) contendo substrato composto por areia e vermiculita em igual proporção. O número de plantas provenientes da cultura de tecidos em meio com 0, 12,5 e 25 mM de NaCl foi, respectivamente, 60, 69 e 46 para a variedade Pérola, e 49, 32 e 23 para a variedade Smooth Cayenne.

As plantas foram avaliadas sob condições de telado, durante os meses de fevereiro a junho de 2001, em Natal, Estado do Rio Grande do Norte (05° 45' 54" de latitude Sul, 35° 12' 04" longitude Oeste e altitude de 20 m). Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados e os tratamentos foram aplicados em esquema fatorial 2 x 3 (2 variedades e 3 doses de NaCl durante o cultivo *in vitro*). Por haver heterogeneidade no tamanho das plantas, elas foram divididas em 3 blocos, de tal modo que cada bloco continha plantas de tamanho homogêneo.

Foram realizadas avaliações aos 0, 15, 45, 75 e 105 dias após o início do experimento, nos seguintes caracteres: i) altura das plantas (AP), medida como a distância entre o colo e o ápice da planta; ii) diâmetro da roseta foliar (DR), medido como a maior distância entre folhas diametralmente opostas; iii) largura da folha 'D' (LD), dada pela distância entre os bordos da folha em sua região central; iv) comprimento da folha 'D' (CD), dada pela distância entre o ápice da folha até o ponto de sua inserção no caule. Foi considerada a folha 'D' aquela cujo ângulo formado com o eixo da planta mais se aproximava de 45°. Os caracteres medidos nesta folha foram avaliados sem destacá-la, visando não prejudicar o desenvolvimento posterior da planta.

Para verificar se o tratamento salino ao qual as plantas haviam sido submetidas influenciou as médias dos caracteres, foram realizadas análises de variância para cada uma das datas de avaliação. As relações entre os caracteres foram determinadas por análises de correlação de Pearson aos 105 dias após o início do experimento. Também foram realizadas análises de regressão para verificar o crescimento das plantas de abacaxi ao longo do tempo. A variância fenotípica das plantas não tratadas com NaCl durante o cultivo *in vitro* foi comparada com a dos grupos tratados com 12,5 e 25 mM de NaCl utilizando teste Box M (Anderson, 1958).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo as análises de variância (Tabela 1), as doses de NaCl aplicadas durante o cultivo *in vitro* não alteraram significativamente as médias dos caracteres. Os efeitos da interação entre variedades e doses de NaCl também não foram significativos, à exceção da análise realizada aos 105 dias no caráter CD. Resultados semelhantes foram obtidos por Lutts et al. (1998), que verificaram médias similares entre plantas de arroz de diferentes variedades obtidas pela cultura de tecidos na presença e na ausência de NaCl. Embora não se tenha verificado diferenças significativas entre as médias das plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de NaCl, algumas plantas apresentavam aspecto diferente do padrão varietal, principalmente aquelas submetidas às doses mais altas do sal durante o cultivo *in vitro*.

Os coeficientes de correlação de Pearson estimados a partir da avaliação realizada aos 105 dias mostraram que todos os caracteres apresentaram correlações entre si, independente do tratamento a que as plantas foram previamente submetidas (Tabela 2). Parte dos coeficientes de correlação das plantas micropropagadas na ausência de NaCl foram diferentes dos verificados nas plantas não submetidas ao sal. As alterações nas correlações foram mais intensas no grupo de plantas cultivadas em meio com 25 mM de NaCl, em que 8 coeficientes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do grupo não submetido ao NaCl (cinco na variedade Pérola e três na variedade Smooth Cayenne). Nas plantas obtidas em meio com 12,5 mM de NaCl apenas o coeficiente de correlação entre o comprimento da folha D e a altura das plantas na variedade Smooth Cayenne apresentou diferenças significativas. A maneira com que as correlações foram alteradas foi diferente nas duas variedades: o valor dos coeficientes nos grupos de plantas em que a micropropagação ocorreu em meio contendo NaCl aumentou

Tabela 1. Resumo das análises de variância dos dados coletados aos 0, 15, 45, 75 e 105 dias após o início do experimento. Altura das plantas (AP), diâmetro da roseta (DR), número de folhas (NF), comprimento da folha D (CD), largura da folha D (LD)

Caráter	FV	0		15		45		75		105	
		GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
AP	Bloco	2	255,69**	2	286,85**	2	670,73**	2	866,68**	2	1392,70**
	Dose NaCl	2	2,91	2	1,40	2	8,76	2	16,69	2	17,41
	Variedade	1	50,20**	1	62,32**	1	7,21	1	429,14**	1	108,29*
	Dose x variedade	2	0,78	2	0,58	2	6,72	2	15,18	2	31,12
	Resíduo	261	1,18	229	1,88	237	4,44	260	7,63	233	20,56
DR	Bloco	2	940,02**	2	942,94**	2	935,98**	2	1560,86**	2	1871,02**
	Dose NaCl	2	2,11	2	10,42	2	4,28	2	13,39	2	21,61
	Variedade	1	0,06	1	53,69**	1	0,02	1	34,84	1	219,65**
	Dose x variedade	2	1,50	2	11,19	2	2,24	2	26,24	2	25,52
	Resíduo	259	3,55	229	3,94	237	8,20	260	14,14	233	28,38
LD	Bloco	2	11,52**	2	11,48**	2	9,37**	2	8,30**	2	5,13**
	Dose NaCl	2	0,06	2	0,15	2	0,03	2	0,27	2	0,02
	Variedade	1	2,08**	1	2,44**	1	4,41**	1	11,36**	1	8,62**
	Dose x variedade	2	0,02	2	0,10	2	0,01	2	0,18	2	0,08
	Resíduo	235	0,06	228	0,09	235	0,18	260	0,27	235	0,27
CD	Bloco	2	330,65**	2	285,35**	2	377,09**	2	712,29**	2	568,05**
	Dose NaCl	2	1,12	2	1,72	2	4,07	2	4,81	2	14,99
	Variedade	1	8,31**	1	14,19**	1	1,36	1	74,89**	1	23,46
	Dose x variedade	2	0,55	2	1,11	2	2,35	2	9,68	2	38,38*
	Resíduo	267	1,44	229	1,44	237	2,69	260	5,12	234	9,36

*, ** Significante a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre os caracteres altura das plantas (AP), diâmetro da roseta (DR), número de folhas (NF), comprimento da folha D (CD) e largura da folha D (LD), observados aos 105 dias após o início do experimento nas plantas em fase de aclimação da variedade Smooth Cayenne (acima da diagonal) e da variedade Pérola (abaixo da diagonal), segundo a dose de NaCl (mM) a que as plantas foram submetidas durante o cultivo *in vitro*

Dose (mM)	Caráter	AP	DR	NF	CD	LD
0	AP	-	0,83	0,76	0,84	0,74
	DR	0,89	-	0,69	0,90	0,82
	NF	0,83	0,80	-	0,73	0,45
	CD	0,93	0,92	0,80	-	0,68
	LD	0,85	0,83	0,70	0,86	-
12,5	AP	-	0,90	0,86	0,93*	0,75
	DR	0,86	-	0,83	0,93	0,87
	NF	0,74	0,75	-	0,82	0,76
	CD	0,92	0,90	0,72	-	0,79
	LD	0,77	0,80	0,59	0,87	-
25	AP	-	0,92	0,87	0,95*	0,84
	DR	0,74*	-	0,90*	0,93	0,87
	NF	0,76	0,65	-	0,92*	0,74
	CD	0,87	0,82*	0,67	-	0,83
	LD	0,67*	0,43**	0,63	0,68*	-

* e ** representam coeficientes de correlação significativamente diferentes ao nível de 5 e 1% dos observados das plantas cultivadas *in vitro* na dose 0 de NaCl

na variedade Smooth Cayenne e diminuiu na variedade Pérola. Esta discrepância no comportamento dos coeficientes deve ter sido ocasionada por diferenças genéticas entre as duas variedades, que sob estresse salino respondem alterando de modo distinto a relação entre os caracteres estudados.

As maiores diferenças no comportamento das plantas tratadas e não tratadas com NaCl durante o cultivo *in vitro* foram verificadas nas variâncias fenotípicas estimadas aos 105 dias após o início do experimento (Tabela 3). Na variedade Pérola, a variância das plantas submetidas ao estresse salino

foi menor do que nas plantas mantidas *in vitro* na ausência do estresse em todos os caracteres. As reduções foram maiores no grupo de plantas que havia sido submetida a seleção em 25 mM de NaCl do que no grupo submetido a 12,5 mM. Na variedade Smooth Cayenne, apenas os caracteres altura das plantas e comprimento da folha D no grupo de plantas tratadas *in vitro* com 25 mM de NaCl apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) da variância fenotípica. Nos demais caracteres as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$). Além da variância fenotípica ter sido alterada em um maior número de caracteres, as reduções verificadas na variedade Pérola foram mais acentuadas do que em Smooth Cayenne. Resultados semelhantes foram obtidos por Lutts et al. (1998), que verificaram redução da variância fenotípica em plantas em arroz regeneradas de calos que haviam sido submetidas ao estresse causado por NaCl em uma ou mais etapas da cultura de tecidos.

Tabela 3. Variância fenotípica das plantas de abacaxi das variedades Pérola e Smooth Cayenne derivadas da micropropagação em meios com diferentes doses (em mM) de NaCl

Variedade	Dose	AP	DR	NF	CD	LD
Pérola	0,0	43,93	64,60	10,61	18,90	0,52
	12,5	45,15	53,49	6,25*	15,51	0,33
	25,0	22,48*	27,62**	5,81*	11,11*	0,20**
Smooth Cayenne	0,0	25,53	28,49	15,39	11,90	0,21
	12,5	23,44	32,16	13,73	11,55	0,23
	25,0	14,97*	21,29	14,05	4,91*	0,14

* e ** representam variâncias significativamente diferentes ao nível de 5 e 1% da variância das plantas cultivadas *in vitro* na dose 0,0 de NaCl

Todas as alterações observadas foram mais acentuadas na variedade Pérola do que na variedade Smooth Cayenne. Isto pode indicar que as doses de NaCl aplicadas durante a fase de multiplicação *in vitro* causaram maior impacto na primeira

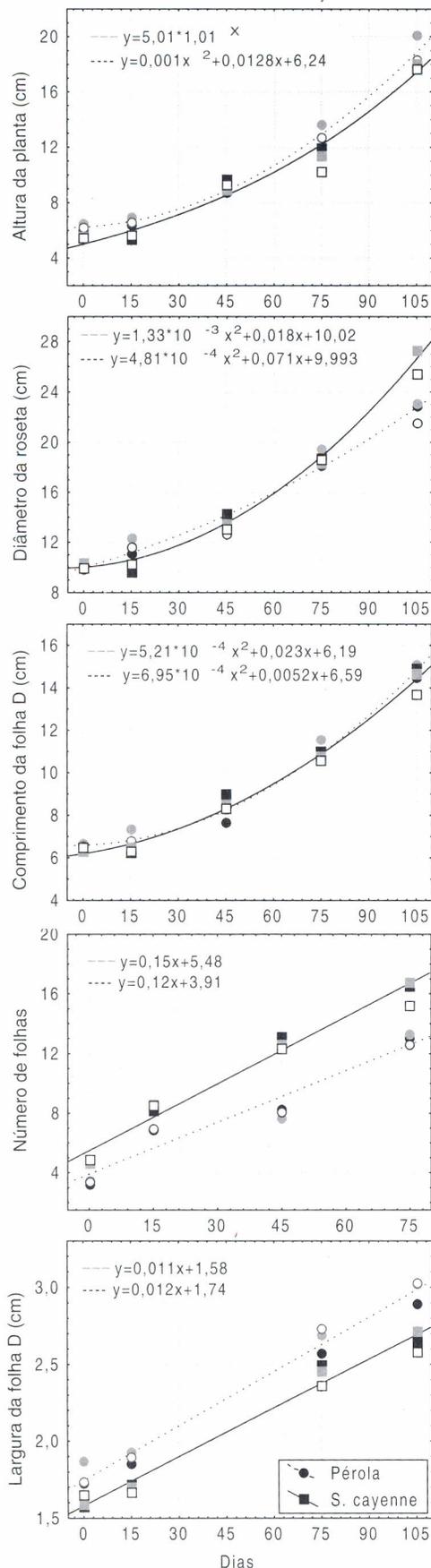


Figura 1. Curvas de crescimento médio das plantas da variedade Smooth Cayenne e Pérola. Símbolos preenchidos em preto, cinza e branco correspondem, respectivamente, às médias obtidas pelo cultivo *in vitro* nas doses de 0, 12,5 e 25,0mM de NaCl

variedade. Este fato concorda com os resultados obtidos por Medeiros et. al (2001), que verificaram que a variedade Pérola é menos resistente ao estresse salino do que a variedade Smooth Cayenne.

O modo com que as plantas das duas variedades cresceram foi similar (Figura 1). As funções que melhor explicaram como o crescimento aconteceu forneceram curvas semelhantes. O número de folhas e a largura da folha D apresentaram crescimento linear durante o período em que as plantas foram avaliadas. O diâmetro da roseta e o comprimento da folha D apresentaram crescimento quadrático. A única variável em que o tipo de regressão melhor se ajustou aos dados foi a altura das plantas, quadrática para a variedade Pérola e exponencial para Smooth Cayenne. Contudo, o ajuste quadrático obtido para Smooth Cayenne foi bastante elevado ($R^2 > 96\%$) e as curvas se assemelham em formato. O número de folhas e a largura da folha D nas duas variedades foram diferentes desde o início e a diferença aumentou lentamente com o passar do tempo. O diâmetro da roseta foi similar em ambas as variedades até o 75º dia. A partir desta data a variedade Smooth Cayenne apresentou crescimento mais acentuado. A observação visual das plantas permitiu observar que este resultado se deve mais ao menor ângulo de inserção das folhas desta variedade do que pelas diferenças no comprimento das folhas. Observando os pontos que indicam as médias de cada um dos tratamentos, verifica-se que o tratamento com NaCl durante o cultivo *in vitro* não alterou substancialmente a média de nenhum dos caracteres estudados, confirmando os resultados obtidos na análise de variância.

Reinhardt (1998) considera a altura ideal para que plantas de abacaxi sejam plantadas a campo como sendo 25 cm. Considerando que as equações podem realizar previsões e que as plantas tinham sido aclimatadas há dois meses, em média, seriam necessários cerca de 130 dias para que as plantas atingissem 25 cm de altura. Portanto, com aproximadamente 6 meses de aclimação as plantas atingiriam tamanho suficiente para serem levadas ao campo. Este período foi similar ao verificado em Cuba por González et al. (1997), trabalhando com a variedade 'Smooth Cayenne'.

Classificando a capacidade de detecção do impacto do cultivo *in vitro* com NaCl em plantas de abacaxi das variedades Pérola e Smooth Cayenne na fase de aclimação, verifica-se que as maiores diferenças foram verificadas pela variância fenotípica, seguido pelo coeficiente de correlação de Pearson. A avaliação da média realizada pela análise de variância não foi capaz de identificar diferenças entre as plantas submetidas a diferentes níveis de estresse salino durante o cultivo *in vitro*. Portanto, estatísticas quadráticas (variância fenotípica e coeficiente de correlação) foram mais eficazes na detecção dos efeitos do estresse salino induzido durante a micropropagação nas plantas na fase de aclimação.

Embora não se tenha buscado uma explicação para este fato, é provável que o estresse salino tenha reduzido a frequência dos tipos extremos, aqueles com valores fenotípicos mais altos e mais baixos, que podem representar somaclones menos tolerantes à salinidade. Esta eliminação seletiva não deve ter sido capaz de alterar a média, visto que os desvios devido à ausência dos maiores e menores valores fenotípicos

praticamente se anulam, não interferindo substancialmente neste parâmetro. Já na variância fenotípica, que mede a dispersão ao redor da média, a redução dos extremos resulta em valores mais baixos.

As diferenças entre as plantas provenientes dos diferentes tratamentos *in vitro* podem ter origem em alterações fisiológicas geradas pelo estresse salino e que permaneceram durante a aclimação. Também podem ser devido à seleção de somaclones mais tolerantes à salinidade. É possível que ambas as causas estejam atuando de modo conjunto. A determinação da importância relativa de cada um destes fatores somente poderá ser avaliada após a dissipação dos efeitos fisiológicos, obtida após 2 a 3 gerações de cultivo. A variabilidade remanescente deve ter origem genética, induzida pelas condições de cultivo *in vitro*, sabidamente mutagênica, e selecionada pela presença do NaCl no meio de cultura.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os efeitos do estresse salino aplicado *in vitro* permanecem durante a aclimação das plantas. A mensuração da intensidade destes efeitos não é adequadamente realizada com a média, devendo ser utilizados parâmetros quadráticos, como a variância fenotípica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, processo número 521.272.198-0(NV).

LITERATURA CITADA

Alvarez, C.E.; Carracedo, A.E.; Iglesias, E.; Bravo, J.J. Pineapple yield and quality on a banana soil of the Canary Islands irrigated with acid and saline water. *Tropical Agriculture*, London, v.72, p.220-224, 1995.

Anderson, T. W. An introduction to multivariate statistical analysis. New York: John Wiley & Sons, 1958.

Barakat, M.N.; Haris, M.K. In vitro selection for salt-tolerant lines in wheat. III. Agronomic evaluation of the progeny under salt stress conditions. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, Alexandria, v.43, p.21-32, 1998.

Blaine, H; Grattan, S. R.; Fulton, A. Agricultural salinity and drainage: A handbook for water managers. Davis: University of California, 1993.

Boscherini, G.; Muleo, R.; Montagni, G.; Cinelli, F.; Pellegrini, M.G.; Bernardini, M.; Buiatti, M. Characterization of salt tolerant plants derived from a *Lycopersicon esculentum* Mill. somaclone. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v.155, p.613-619, 1999.

Fageria, N.K.; Gheyi, H.R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: Gheyi, H.R.; Queiroz, J.E. de; Medeiros, J.F. de (eds.) Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: SBEA/UFPB, 1997, p.363-383.

González, R.R.; Dominguez, Q.M.; Expósito, L.A. G.; González, J.L.O.; Matínez, T.R.; Hidalgo, M.S. Efectividad de ocho cepas de *Azotobacter* en la adaptación de vitroplantas de piña (*Anana comosus* (L.) Merr.), cv. 'Cayena Lisa'. *Acta Horticulturae*, Hague, v.425, p.277-284, 1997.

Liu, T; Staden, J. Selection and characterization of sodium chloride-tolerant callus of *Glycine max* (L.) Merr. cv. Acme. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v.31, p.195-207, 2000.

Lutts, S.; Kinet, J.M.; Bouharmont, J. NaCl impact on somaclonal variation exhibited by tissue culture-derived fertile plants of rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Plant Physiology*, Rockville, v.152, p.92-103, 1998.

Marinho, F.J.L.; Fernandes, P.D.; Gheyi, H.R. Desenvolvimento inicial do abacaxizeiro, cv. Smooth Cayenne, sob diferentes condições de salinidade da água. *Campina Grande: Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.2, p.1-5, 1998.

Medeiros, D.N.; Macedo, C.E.C.; Alloufa, M.A.I. Efeito do NaCl sobre a multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. V.23, n.1, p.1-5, 2001.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, v.15, p.473-479, 1962.

Oliveira, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: Gheyi, H.R.; Queiroz, J.E.; Medeiros, J.F. de (eds.) Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: SBEA/UFPB, p.1-35, 1997.

Reinhardt, D.H.R.C. Manejo e produção de mudas de abacaxi. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.19, n.195, p.13-19, 1998.

Safarnejad, A.; Collin, H.A.; Bruce, K.D.; McNeilly, T.; Tigerstedt, P.M.A. Characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following *in vitro* selection for salt tolerance. *Euphytica*, Wageningen, v.92, p.55-61, 1996.

Winicov, I. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. *Plant Science*, Amsterdam, v.113, p.105-111, 1996.